

ĐURĐA ILIĆ-BAUS¹, VLADIMIRKA ILIĆ^{2*},
MAJA KARAMAN¹

¹Univerzitet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju,
Novi Sad, Srbija, ²Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski Fakultet,
Novi Sad, Srbija

Naučni rad
ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585
UDC:632.4:669.24/.29
doi:10.5937/ZasMat15044471



Zastita Materijala 56 (4)
447 - 456 (2015)

Uticaj Ni, Cu i Cd na brojnost filamentoznih gljiva u zemljištu sa zasadima klonova topole M1, PE19/66 i B229

IZVOD

Više od tristotine godina teški metali predstavljaju, pored pesticida u poslednjih pedeset godina, kvantitativno najprisutnije polutante u okruženju. Ukupna koncentracija teških metala u životnom okruženju se ne reflektuje direktno na stepen njihove toksičnosti ili njihove dostupnosti mikroorganizmima, što dodatno otežava tačnu procenu rizika koji sami metali imaju u sredinama u kojima su prisutni. Izuzetno je važno naglasiti uticaj teških metala na antibiotske sposobnosti mikroorganizama.

Tokom eksperimentalnog rada vršeno je ispitavanje uticaja određenih koncentracija Ni, Cu i Cd na brojnost mikroorganizama u zemljištu sa zasadima 3 klonova topole. Prema dobijenim eksperimentalnim rezultatima, uticaj Ni, Cu i Cd na brojnost plesni u zemljištu može dovesti to povećanja njihove brojnosti što se stavlja u blisku korelaciju sa odgovarajućim klonom topole.

Ključne reči: Ni, Cu, Cd, brojnost filamentoznih gljiva, zemljište, topola.

1. UVOD

Prisustvo teško razgradivih polutanata predstavlja veliko opterećenje za održanje i normalno funkcionisanje ekosistema, što utiče na zdravstveno stanje svih živih organizama u njima, pa samim tim i na zdravlje ljudi. Danas se teži sprečavanju daljeg širenja negativnog uticaja teških metala na žive organizme. Akcenat je na proučavanju uloge odbrambenih mehanizama samih mikroorganizama u bioremedijaciji. Izuzetno je važno naglasiti uticaj teških metala na antibiotske sposobnosti mikroorganizama [1].

Ukupna koncentracija teških metala u životnom okruženju se ne reflektuje direktno na stepen njihove toksičnosti ili njihove dostupnosti mikroorganizmima, što dodatno otežava tačnu procenu rizika koji metali imaju u sredinama u kojima su prisutni [2]. Teški metali mogu biti dostupni mikroorganizmima ukoliko su podložni transformaciji pod uticajem mikroorganizama koji su sposobni da formiraju egzopolimere sa metalima čime redukuju

njihovu toksičnost [1]. Kao posledica prisustva nekog polutanta u zemljištu, određeni mikroorganizmi se ne mogu adaptirati na takve uslove, pa ih zamenjuju rezistentnije vrste, što dovodi do promena odnosa broja vrsta kao i njihove ukupne biomase.

Ispitivani teški metali u najvećem broju slučajeva pokazuju inhibitorski efekat na rast mikroorganizama sa povećanjem njihove koncentracije, dok razlike u povećanju broja mikroorganizama pri 3MDK koncentracijama Ni, Cu, i Cd za klonove topole M1, PE19/66 i B229 su rezultat pojave rezistentnosti mikroorganizama usled aktivacije odgovarajućih odbrambenih mehanizama, rastvorljivosti metala sa promenom pH vrednosti i sastava podloge. Mikroorganizmi igraju nezamenjivu ulogu u geohemijskim ciklusima kruženja mnogih elemenata, te su neophodni i u uklanjanju polutanata.

2. MATERIJAL I METODE RADA

Tokom eksperimentalnog rada vršeno je ispitavanje uticaja određenih koncentracija Ni, Cu i Cd na brojnost mikroorganizama u zemljištu. Pre uzorkovanja zemljište je zasađeno mladima sledećih klonova topole (*Populus sp.*): M1, PE19/66 i B229. Za eksperiment su upotrebljeni uzorci zemljišta sa zasađenim klonovima topole, bez metala, sa MDK (MDK-maksimalna dozvoljena koncentracija) i 3 MDK (tabela 1)

*Autor za korespondenciju: Vladimirka Ilić

E-mail: vladimirka88@gmail.com

Rad primljen: 21. 06. 2015.

Rad prihvaćen: 16. 08. 2015.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

Tabela 1 - Klonovi topola zasađeni na uzorcima sa određenim koncentracijama metala

Uzorak	1.1z	1.3z	1.5z	1.6z	1.8z	1.10z	1.11z	1.13z	1.15z
Klon	M1	M1	M1	PE19/66	PE19/66	PE19/66	B229	B229	B229
Metal	bez Ni	MDK Ni	3MDK Ni	bez Ni	MDK Ni	3MDK Ni	bez Ni	MDK Ni	3MDK Ni
Konc. mg/kg	0	50	150	0	50	150	0	50	150
Uzorak	2.1z	2.3z	2.5z	2.6z	2.8z	2.10z	2.11z	2.13z	2.15z
Klon	M1	M1	M1	PE19/66	PE19/66	PE19/66	B229	B229	B229
Metal	bez Cu	MDK Cu	3*MDK Cu	bez Cu	MDK Cu	3MDK Cu	bez Cu	MDK Cu	3MDK Cu
Konc. mg/kg	0	100	300	0	100	300	0	100	300
Uzorak	3.1z	3.3z	3.5z	3.6z	3.8z	3.10z	3.11z	3.13z	3.15z
Klon	M1	M1	M1	PE19/66	PE19/66	PE19/66	B229	B229	B229
Metal	bez Cd	MDK Cd	3MDK Cd	bez Cd	MDK Cd	3MDK Cd	bez Cd	MDK Cd	3MDK Cd
Konc. mg/kg	0	3	9	0	3	9	0	3	9

2.1. Određivanje ukupne brojnosti filamentoznih gljiva

Izolacija i određivanje broja filamentoznih gljiva vrši se pomoću odgajivačke metode na agarizovanoj podlozi. Serije razređenja su pripremljene tako što se odgovarajuća količina zemljišta rastvori u 0,1% rastvoru Na-pirofosfata. Odmerenih 5g zemljišta se dodaje u 47,5ml NaPP (Na-pirofosfata). Rastvor zemljišta se promecka i po 1ml početne suspenzije se prenese u 9ml rastvora za razređenje u epruvetama kako bi se napravile serije razređenja. Nakon završene inkubacije uzimaju se u obzir samo ona razređenja u kojima se broj kolonija kreće između 30 i 300. Dobijeni rezultati su izraženi na 1g suvog zemljišta. Određivanje ukupne brojnosti filamentoznih gljiva je vršeno na Roze bengal-streptomycin podlozi. Inkubacija zasejanih uzoraka je trajala 5-7 dana na temperaturi od 26°C.

2.2. Određivanje sadržaja vlage u zemljištu

Brojnost mikroorganizama se izražava u odnosu na gram apsolutno suvog zemljišta. Nakon sušenja zemljišta radi uklanjanja slobodne i strukturne vode pristupa se izračunavanju gravimetrijskog sadržaja vlage prema definiciji:

$$\theta_g = \frac{(m-d)}{d}$$

Tabela 2 - Izračunavanje sadržaja vlage u zemljištu

Uzorak	MP (g)	MP+VZ (g)	MP+SZ (g)	m (g)	d (g)	$\theta_g=(m-d)/d$	θ_g (%)
1.1z	31,34	36,34	36,31	5	4,97	0,006	0,6
1.3z	29,48	34,48	34,46	5	4,48	0,004	0,4
1.5z	32,16	37,16	37,13	5	4,97	0,006	0,6

MP- masa prazne posude, MP+VZ- masa posude sa vlažnim zemljištem, MP+SZ- masa posude sa suvim zemljištem, m- masa vlažnog zemljišta (MP+VZ-MP), d- masa suvog zemljišta (MP+SZ-MP), θ_g (%) - gravimetrijska vlažnost zemljišta u procentima. Za statističku obradu podataka korišten je Microsoft Office Excell 2007.

$$\theta_g \times d = m - d > \theta \times d + d = m > d \times (\theta_g + 1) = m > d = \frac{m}{(\theta_g + 1)}$$

θ_g - gravimetrijski sadržaj vlage;

m- masa vlažnog zemljišta pre sušenja;

d - masa zemljišta posle sušenja.

Pre određivanja vlažnosti zemljišta izmerena je masa praznog vegeglasa, masa vegeglasa sa zemljištem pre i posle sušenja. U ovom radu zemljište je sušeno 3h na temperaturi od 100-120°C dok nije dobijena konstantna masa suvog zemljišta. Na osnovu formule za gravimetrijsku vlažnost zemljišta izračunato je koliko grama suvog zemljišta je dodato u prvo razređenje (tabela 2).

Izračunat je broj kolonija plesni u 1g suvog zemljišta nakon određivanja mase suvog zemljišta sadržanog u 5 g vlažnog zemljišta u 1ml suspenzije različitih razređenja. Ako je vlažnost zemljišta iznosila 0,006 onda je d=4,97 onda je u erlenmajer sa 10⁻¹ dodato 5g vlažnog, odnosno 3,125g suvog zemljišta. Broj gljiva u 1g zemljišta je računat prema formuli:

broj kolonija gljiva/1g suvog zemljišta = broj kolonija gljiva/masa suvog zemljišta (g) za dato razređenje

2.3. Utvrđivanje pH vrednosti zemljišta

Određivanje pH vrednosti zemljišta je vršeno pripremanjem rastvora zemljišta u destilovanoj vodi (dH₂O) nakon čega je pristupljeno očitavanju vrednosti pH pomoću pH-metra. Suspenzija zemljišta je pravljena dodavanjem 10g zemljišta u 25ml dH₂O. Tokom merenja pH vrednosti, suspenzija zemljišta je stalno mešana na magnetnoj mešalici do postizanja konstantne vrednosti pH.

3. REZULTATI

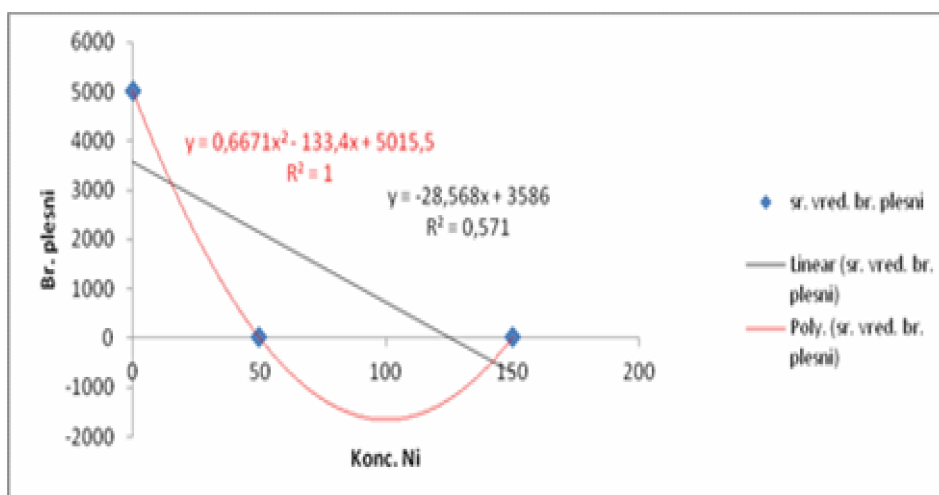
Tokom eksperimenta je obrađeno 27 uzoraka zemljišta zasejanih sa tri klona topole (M1, PE19/66, B229). Zemljište je tretirano različitim koncentracijama metala (Ni, Cu, Cd) sa ciljem određivanja uticaja koncentracije metala na brojnost plesni.

Na osnovu dobijenih pH-vrednosti utvrđeno je da ne postoje značajne rezlike u pH vrednosti iz-

među pojedinačnih uzoraka za klonove topole M1, PE19/66 i B229 i da zemljišta imaju slabo alkalnu pH vrednost (≈8). Vrednosti pH su se za klon topole M1 kretale u opsegu od 8,04 do 8,29, za klon topole PE19/66 od 8,13 do 8,3 i za klon topole B229 od 7,94 do 8,27. Stoga se smatra da ovaj faktor ne igra značajnu ulogu u promeni brojnosti mikroorganizama.

3.1. Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije brojnosti plesni pri različitim koncentracijama Ni u zemljištu

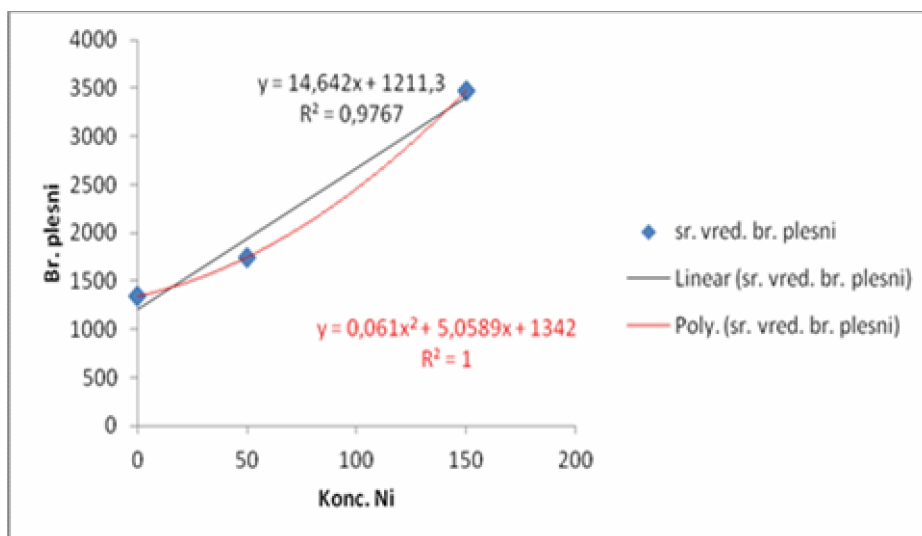
Klon M1. Određivanjem koeficijenta korelacije ($r = -0,76$) za brojnost plesni na različitim koncentracijama Ni (0, 50, 150 mg/kg) za klon topole M1 utvrđena je visoka negativna korelacija između brojnosti plesni i povećanja koncentracije Ni (slika 1).



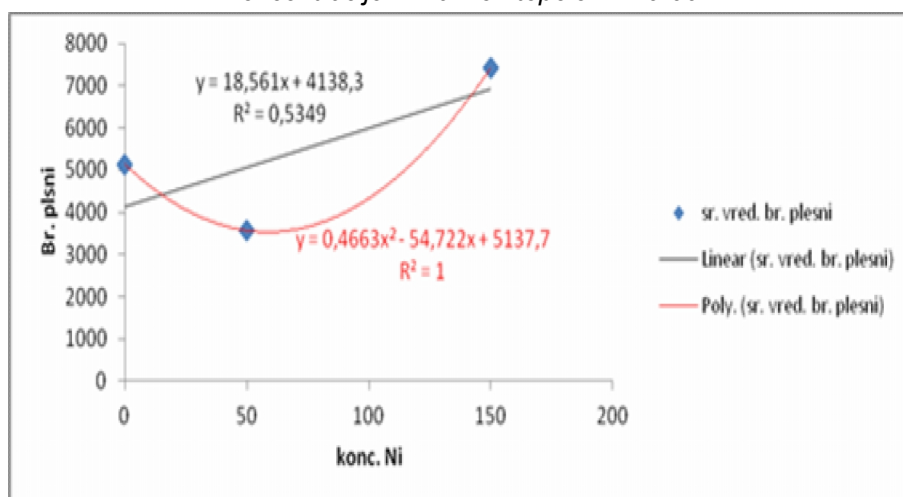
Slika 1 - Linearna i polinomska zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Ni za klon topole M1

Klon PE19/66. Na osnovu određenog koeficijenta korelacije ($r = 0,98$) za brojnost plesni u odnosu na povećanje koncentracije Ni (0, 50, 150 mg/kg) za klon topole PE19/66 ustanovljena je vrlo visoka pozitivna korelacija, ali i bliska povezanost dva parametra. Prema izračunatom koeficijentu determinacije ($R^2 = 0,097$) moguće je govoriti o rastu broja plesni sa povećanjem koncentracije Ni što je prikazano linearnom zavisnošću na grafikonu (slika 2). Praćenjem polinomske promene broja plesni sa koeficijentom determinacije od ($R^2 = 1,00$) sa porastom koncentracije Ni dolazi do rasta brojnosti plesni.

Klon B229. Izračunavanjem koeficijenta korelacije ($r = 0,73$) za promenu brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Ni (0, 50, 150 mg/kg) utvrđena je visoka pozitivna povezanost dva parametra, što znači da sa povećanjem koncentracije Ni za klon topole B229 sa dolazi do značajnog porasta brojnosti plesni (slika 3). Prema koeficijentu determinacije ($R^2 = 0,53$) uočava se mogući trend daljeg povećanja brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Ni. Polinomska zavisnost ukazuje da brojnost plesni opada od 0-50 mg/kg nakon čega se uočava značajan porast. Ovakva promena brojnosti je moguća usled delovanja drugih parametara pored ispitane koncentracije Ni i pH vrednosti.



Slika 2- Linearna i polinomialna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Ni za klon topole PE19/66



Slika 3 - Linearna i eksponencijalna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Ni za klon topole B229

Prema izračunatim koeficijentima korelacije i determinacije za klon topole M1 utvrđena je umerena korelacijska povezanost sa tendencijom opadanja brojnosti plesni u odnosu na povećanje koncentracije Ni (tabela 3). Vrednosti koeficijenata korelacije i determinacije za klonove topole PE19/66 i B229 uočena je bitna međuzavisnost promene brojnosti plesni u odnosu na promenu koncentracije Ni. Promena brojnosti plesni kod klonova topole PE19/66 i B229 se odnosi se na rast brojnosti sa povećanjem koncentracije Ni.

Tabela 3. - Vrednosti koeficijenata korelacije i determinacije za Ni

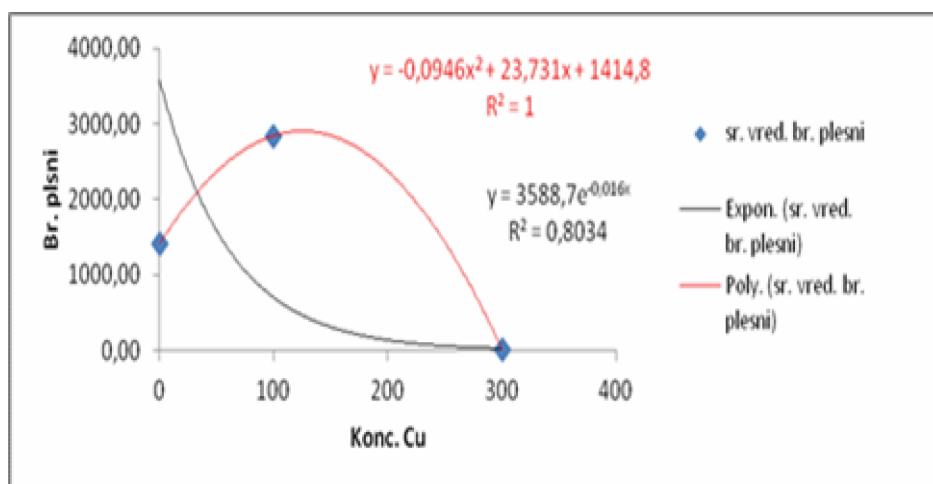
Klon topole	Metal	Ko. korelacije	Ko. determ.
M1	Ni	-0,76	0,57
PE19/66	Ni	0,98	0,98
B229	Ni	0,73	0,53

3.2. Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije brojnosti plesni pri različitim koncentracijama Cu u zemljištu

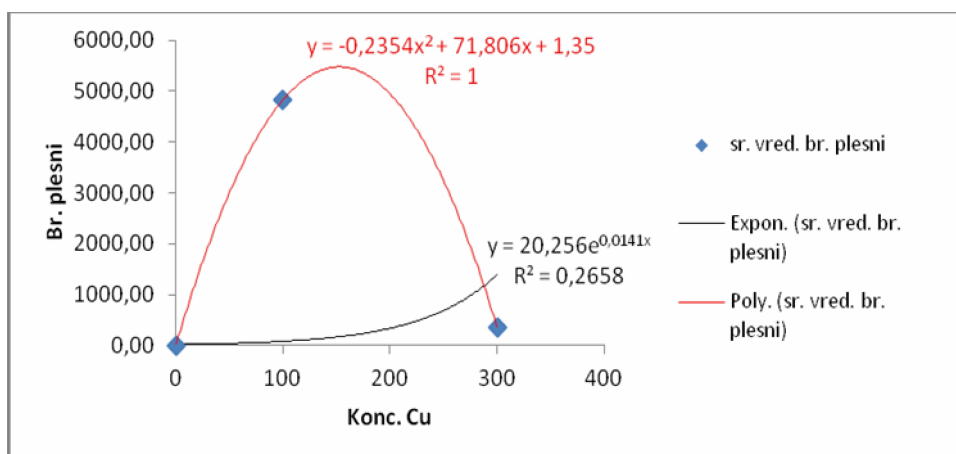
Klon M1. Praćenjem promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cu (0, 100, 300 mg/kg) izračunat je koeficijent korelacije ($r = -0,65$) koji ukazuje na umerenu korelaciju i bitnu povezanost smanjenja broja plesni sa porastom koncentracije Cu (slika 4). Na osnovu izračunatog koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,80$) ne može se predvideti dalji tok promene brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cu. Polinomialna zavisnost ukazuje na postepen rast broja plesni do koncentracije Cu od 100 mg/kg nakon čega njihova brojnost pada zbog čega se pretpostavlja da koncentracija Cu i pH vrednost nemaju jasno izražen uticaj na brojnost plesni sa promenom koncentracije Cu za klon topole M1.

Klon PE19/66. Koeficijent korelacije ($r = -0,12$) određen za broj plesni u odnosu na koncentraciju Cu (0, 100, 300 mg/kg) ne pokazuje postojanje korelacije između promene brojnosti bakterija i povećanja koncentracije Cu za klon topole PE19/66. Na osnovu koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,27$) nije moguće predvideti kretanje promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cu, pa je stoga utvrđena bolja zavisnost ova dva faktora koji su ispoljili koeficijent detereminacije ($R^2 = 1,00$), što je i grafički prikazano u vidu eksponencijalne zavisnosti (slika 5). Prema polinomialnoj zavisnosti, navedene promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cu u vidu naglog rasta i naglog pada se mogu objasniti delovanjem nekih drugih faktora.

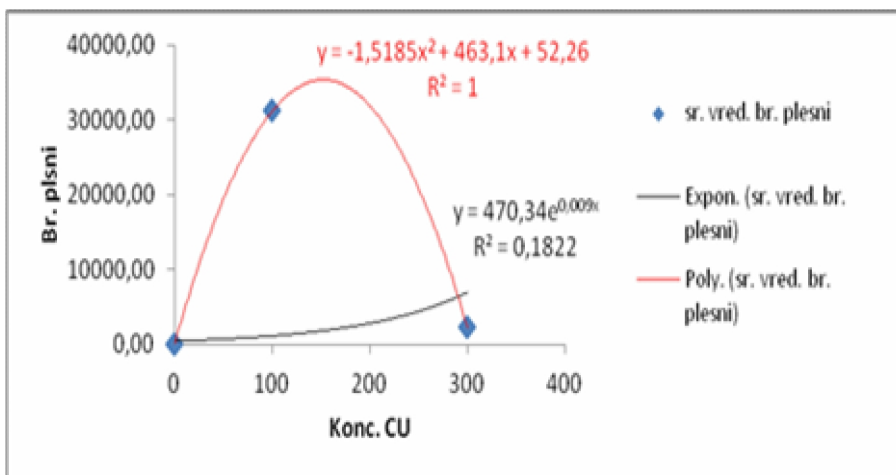
Klon B229. Promena broja plesni u odnosu na povećanje koncentracije Cu (0, 100, 300 mg/kg) prikazana je na grafiku (slika 6). Na osnovu izračunatog koeficijenta korelacije ($r = -0,12$) utvrđeno je da promena brojnosti plesni ne prati povećanje koncentracije Cu, te da ne postoji korelacija između ova dva parametra. Koeficijent determinacije ($R^2 = 0,18$) ne ukazuje na mogućnost praćenja toka promene broja plesni sa porastom koncentracije Cu. Stoga je određena i polinomialna zavisnost pri čemu se jasno uočava porast brojnosti plesni do koncentracije Cu od 100 mg/kg, nakon čega sledi njen pad. Jedna od pretpostavki navedenog trenda promene brojnosti se ne može objasniti samo na osnovu povećanja koncentracije Cu.



Slika 4 - Eksopencijalna i polinomialna zavisnost promene broja plesni na različitim koncentracijama Cu za klon topole M1



Slika 5 - Eksopencijalna i polinomialna zavisnost promene broja plesni na različitim koncentracijama Cu za klon topole PE19/66



Slika 6 - Eksponencijalna i polinomialna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cu za klon tople B229

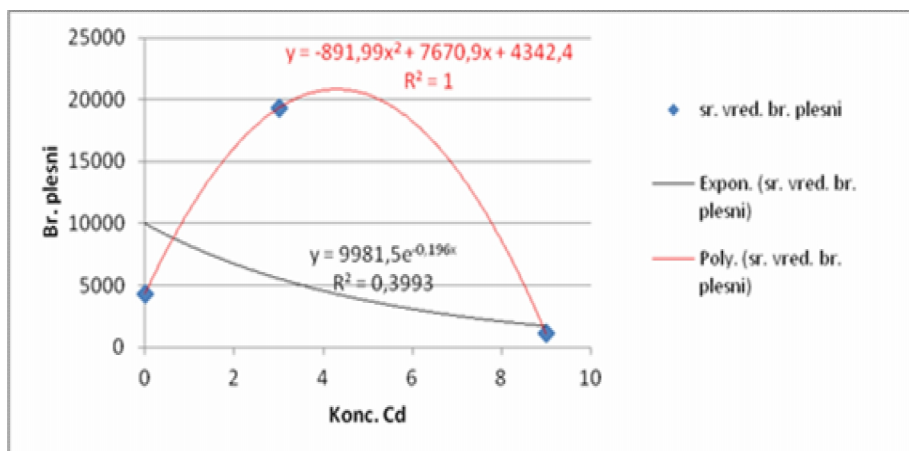
Na osnovu izračunatog koeficijenta korelacije i determinacije za promenu brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cu za klon tople M1 utvrđena je umerena zavisnot smanjenja brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cu. Promena brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cu za klonove topole PE19/66 i B229, prema koeficijentima korelacije i determinacije, ne odlikuju se postojanjem međusobne povezanosti u smislu opadanja brojnosti sa povećanjem koncentracije Cu (tabela 4).

Tabela 4 - Vrednosti koeficijenata korelacije i determinacije za Cu

Klon topole	Metal	Ko. korelacije	Ko. determ.
M1	Cu	-0,65	0,80
PE19/66	Cu	-0,12	0,27
B229	Cu	-0,12	0,18

3.2. Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije brojnosti plesni pri različitim koncentracijama Cd u zemljištu

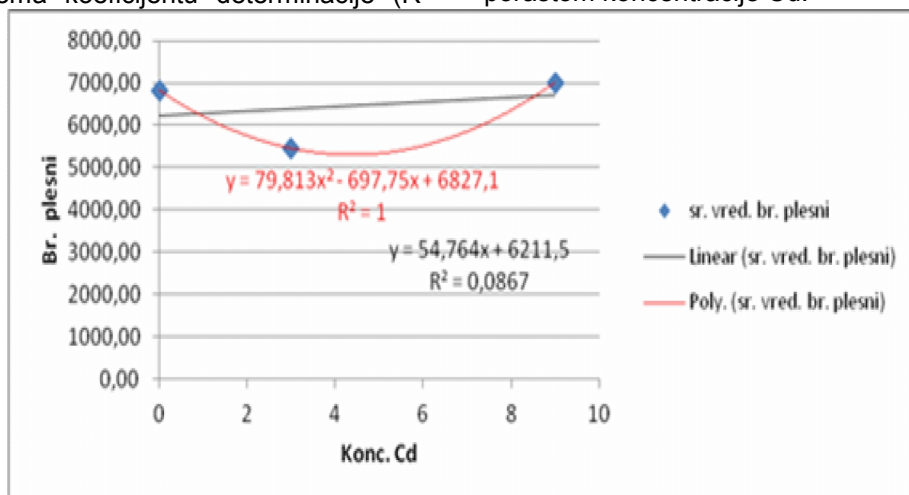
Klon M1. Na osnovu izračunatog koeficijenta korelacije ($r = -0,35$) za promenu broja plesni sa porastom koncentracije Cd (0, 3, 9 mg/kg) utvrđeno je da postoji niska korelacija između ova dva parametra određeno za klon topole M1. Prema koeficijentu determinacije ($R^2 = 0,40$) ne može se tačno predvideti dalja promena broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd. Polinomialna zavisnost pokazuje trend rasta broja plesni do koncentracije Cd 4 mg/kg, nakon čega sledi njen pad (slika 7), zbog čega se može reći da na promenu broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd ulogu imaju neki drugi faktori koje naknadno treba ispitati. Očigledno je da uticaj Cd pri nižim koncentracijama ima pozitivan efekat za plesni, dok se pri koncentracijama višim od 4 mg/kg uočava njegovo toksično delovanje.



Slika 7 - Linearna i polinomialna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd za klon topole M1

Klon PE19/66. Određivanjem koeficijenta korelacije ($r= 0,29$) na osnovu srednjih vrednosti broja plesni u odnosu na koncentraciju Cd (0, 3, 9 mg/kg) utvrđeno je da postoji mala povezanost broja plesni i koncentracije Cd za klon topole PE19/66. Uočeno je da sa povećanjem koncentracije Cd dolazi do neznatnog porasta broja plesni te da se prema koeficijentu determinacije ($R^2=$

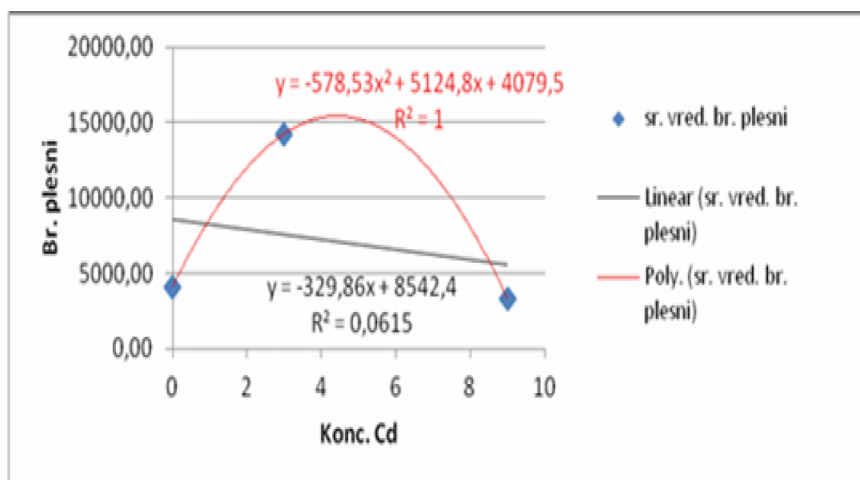
0,09) takav tok promene broja plesni ne može predvideti dalja promena broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd (slika 8). Polinomialna zavisnost sa koeficijentom determinacije od ($R^2= 1,00$) prema promeni broja plesni u odnosu na koncentraciju ukazuje na postojanje drugih faktora čiji se efekat ogleda u povećanju broja plesni sa porastom koncentracije Cd.



Slika 8 - Linearna i polinomialna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd za klon topole PE19/66

Klon B229. Prema izračunatom koeficijentu korelacije ($r= -0,25$) uočena je mala povezanost između promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd (0, 3, 9 mg/kg) za klon topole B229. Koeficijent determinacije ($R^2= 0,06$) potvrđuje trend opadanja brojnosti plesni sa

povećanjem koncentracije Cd, što je predstavljeno na grafiku (slika 9). Polinomialna zavisnost promena broja plesni u odnosu na koncentraciju Cd ukazuje da povećanje koncentracije Cd iznad 3 mg/kg ima izražen negativan uticaj na broj plesni, tj. utiče na drastično smanjenje brojnosti plesni.



Slika 9 - Eksponencijalna i polinomialna zavisnost promene broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd za klon topole B229

Ispitivanjem promene brojnosti bakterija sa povećanjem koncentracije Cd za klonove topole M1, PE19/66 i B229 utvrđene su negativne korelacije (tabela 5). Na osnovu određenog koeficijenta korelacije i determinacije za klonove topole M1 usta-

novljeno je da ne postoji korelacijska zavisnost između brojnosti bakterija sa povećanjem koncentracije Cd. Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije za klonove topole PE19/66 i B229 ukazuju na visoku korelacijsku zavisnost smanjenja

brojnosti bakterija sa povećanjem koncentracije Cd.

Određivanjem koeficijenta korelacije i determinacije za klonove topole M1, PE19/66 i B229 utvrđeno je da postoji umerena povezanost promene brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cd. Za klonove topole M1 i B229 određen je negativan koeficijent korelacije koji ukazuje da sa povećanjem koncentracije Cd dolazi do opadanja brojnosti plesni. Prema koeficijentu korelacije za klon topole PE19/66 uočeno je da postoji slaba povezanost između povećanja brojnosti plesni i sa rastom koncentracije Cd.

Tabela 5 - Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije za Cd

Klon topole	Metal	Koef. Korel.	Koef. Determ.
M1	Cd	-0,35	0,39
PE19/66	Cd	0,29	0,08
B229	Cd	-0,24	0,06

4. DISKUSIJA

Tokom eksperimenta vršeno je ispitivanje promene broja plesni na različitim koncentracijama metala (Ni, Cu, Cd) za tri klona topole (M1, PE19/66, B229). Prema dobijenim rezultatima utvrđeno je da promena broja plesni zavisi od koncentracije i vrste metala kojem su podvrgnute tokom eksperimenta. Efekat teških metala na mikroorganizme zemljišta se ogleda u promeni diverziteta mikroflore zemljišta usled toksičnog delovanja metala na osetljive vrste mikroorganizama [3]. Uticaj toksičnih jedinjenja na rast mikroorganizama može dovesti do naknadnog povećanja brojnosti metal-rezistentnih mikroorganizama usled smanjenja i inhibicije aktivnosti osetljivih vrsta mikroorganizama [4]. Stvarajući selektivnu sredinu sa malim diverzitetom, biljke utiču na mikroorganizme u zemljištu favorizujući one vrste koje najbolje odgovaraju njenim osnovnim fiziološkim i nutritivnim potrebama. Prisustvo siderofora u bakterijama i plesnima dovodi do vezivanja esencijalnih metala čime se onemogućava opstanak potencijalnih biljnih patogenih organizama [5]. U takvom odnosu mikroorganizmi pružaju biljci, pored nutritivnih jedinjenja, i vid zaštite od patogenih organizama što ujedno može dovesti i do favorizovanja rasta vrsta koje su otporne na visoke koncentracije teških metala. Na osnovu utvrđenih pH vrednosti uzoraka zemljišta ustanovljeno je da pH zemljišta nema bitan uticaj na brojnost mikroorganizama usled povećanja koncentracije metala (Ni, Cu, Cd).

Gljive su više tolerantne prema stresnim uslovima izazvanim visokim koncentracijama metala u

odnosu na druge grupe mikroorganizama [6]. Na osnovu dobijenih vrednosti broja plesni za različite koncentracije Ni, utvrđeno je smanjenje broja filamentoznih gljiva sa povećanjem koncentracije Ni za klon topole M1. Prema koeficijentu korelacije ($p = -0,7556$) za klon topole M1 može se očekivati dalji pad broja plesni sa rastom koncentracije Ni. Prema [7] sa povećanjem koncentracije Ni dolazi do opadanja broja plesni dok je totalna inhibicija rasta ustanovljena pri koncentraciji Ni od 200 mg/l. U [8] autori navode povećanu osetljivost filamentoznih gljiva koje vrše razgradnju šumskog pokrivača na niže koncentracije Ni (20-100 mg kg⁻¹) što se značajno odražava na njihove fiziološke i metaboličke procese. Povećanje koncentracije Ni za klon topole PE19/66 karakteriše se povećanjem brojnosti filamentoznih gljiva. Kod klona topole B229 broj plesni sa povećanjem koncentracije Ni je pokazivao tendenciju rasta. Povećanje otpornosti prema Ni koje se odlikuje porastom broja plesni je rezultat vezivanja Ni za histidin u vakuolama što je potvrđeno kod *Sacharomices cerevisiae* [8]. Povećanje broja plesni pri većim koncentracijama Ni se može objasniti aktiviranjem odbrambenih mehanizama i uklanjanjem Ni iz podloge bioakumulacijom. Proces detoksikacije Ni uključuju aktivnost metalotionina i γ -glutamil peptida [9]. Povećanje otpornosti gljiva prema Ni i sposobnost njegovog uklanjanja u procesu bioremedijacije se povećava ukoliko je podloga obogaćena dodavanjem glukoze i sukroze [10]. Otpornost plesni prema Ni i sposobnost uklanjanja Ni od strane plesni zavisi i od pH sredine. Sa povećanjem pH vrednosti raste rastvorljivost Ni zbog čega je olakšano njegovo uklanjanje procesom vezivanja za negativno naelektrisanu delove ćelijskog zida naročito pri pH>5 [11]. Dobijene vrednosti promene brojnosti plesni na različitim koncentracijama su u skladu sa literarnim navodima.

Ispitivanjem uticaja različitih koncentracija Cu na promenu brojnosti plesni za sva tri klona topole (M1, PE19/66, B229), najveća brojnost je ustanovljena pri koncentraciji Cu od 100 mg/kg. Najmanja brojnost filamentoznih gljiva za sva tri klona topole je utvrđena pri koncentraciji Cu od 300 mg/kg. U odnosu na različite tipove zemljišta sa različitim koncentracijama metala najveći broj plesni je potvrđen u obradivim površinama, dok je njihova brojnost bila znatno manja u zemljištu tretiranom Cu [6]. Toksičan efekat Cu zavisi i od pH vrednosti podloge na kojoj raste plesan. Rast *Endothia parasitica* je bio stimulisan prisustvom CuSO₄ pri pH=4 do pH=8 dok je rast iste vrste bio znatno slabiji u odsustvu Cu pri istoj pH vrednosti podloge [12]. takođe navode da je rast micelije *E. parasitica*

u tečnoj podlozi bio značajno bolji pri nižim koncentracijama Cu nego pri većim koncentracijama koja je delovala izuzetno stimulatивно na rast micelije u čvrstoj podlozi. Ispitivanjem tolerancije *Aspergillus lentilus* na toksičan efekat Cu utvrđeno je da ova vrsta može da podnese visoke koncentracije Cu od 550 mg/l u čvrstoj podlozi. Efekat Cu na rast zavisi i od sposobnosti usvajanja glukoze i aklimatizacije plesni na toksičnost Cu. Tokom intenzivne faze rasta *A. lentilus* usvajanje glukoze je bilo znatno slabije u prisustvu Cu što je rezultovalo manjom biomasom, međutim nakon aklimatizacije na prisustvo Cu produkcija biomase je nakon 120h bila ista kao i u odsustvu Cu [13]. Visoke vrednosti broja plesni u ovom radu su najverovatnije rezultat povećanog usvajanja Cu pri pH oko 8 kao i razvijene tolerancije prema ovom metalu što se nalazi u skladu sa dobijenim vrednostima brojnosti plesni u navedenim radovima.

Prema određenim koeficijentima korelacije za uticaj različitih koncentracija Cd na rast plesni ustanovljena je mala povezanost ova dva parametra za sva tri klona topole (M1, PE19/66 i B229). Smanjenje brojnosti plesni sa povećanjem koncentracije Cd detektovano je samo za klonove topole M1 i B229 dok je broj plesni za klon topole PE19/66 pokazivao blagi porast sa povećanjem koncentracije Cd. Relativno visok broj plesni je ustanovljen za koncentraciju Cd od 3mg/kg za klonove topole M1 i B229 dok je najveća brojnost plesni za klon topole PE19/66 ustanovljena pri koncentraciji od 9 mg/kg. Efekat Cd na plesni se ogleda u smanju broja plesni sa povećanjem koncentracije Cd uz određenu minimalnu inhibitrnu koncentraciju Cd za plesni od 125µg Cd/kg do 550µg Cd/kg zemljišta [14]. Zbog svoje mobilnosti u zemljištu Cd postaje lakše dostupan biljkama i drugim mikroorganizmima u odnosu na druge metale. Cd je izuzetno toksičan za gljive i njegova toksičnost raste sa povećanjem pH vrednosti sredine [9]. Osnovni uzrok toksičnosti Cd ogleda se u njegovoj sposobnosti vezivanja za tiolne grupe enzima i proteina, inhibiciji disanja i transporta elektrona u procesu oksidativne fosforilacije [15]. Prema [16] rast micelije *Aspergillus niger* i *A. fischeri* je bio znatno redukovano u odsustvu Cd pri pH vrednosti zemljišta od pH=5,1 do pH=7,2 dok koncentracija Cd od 10 µg/g nije značajno uticala na stepen rasta micelije navedenih vrsta. Stepenn rasta micelije *A. niger* je značajno redukovano pri koncentraciji Cd od 100-250 µg/g uz povećanje pH vrednosti zemljišta, usled nemogućnosti tolerancije dodatnog opterećanja Cd u alkalnim sredinama [16]. Plesni lakše podnose veće koncentracije Cd u zemljištu nego kada rastu na čvrstoj podlozi, što se može povezati sa interakcijom Cd sa organskim i mineralnim materijama zemljišta kao i sa usvajanjem

od strane biljaka [16]. Dobijeni rezultati brojnosti filamentoznih gljiva su u skladu sa navedenim radovima.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivanjem uticaja različitih koncentracija Ni na rast plesni može se zaključiti da postoji visok inhibitorski efekat na rast mikroorganizama. Odgovarajuća odstupanja u smislu povećanja brojnosti mikroorganizama se javljaju zbog rezistentnosti mikroorganizama prema visokim koncentracijama Ni.

Efekat različitih koncentracija Cu na brojnost plesni se karakteriše povećanom optornosti pri koncentraciji Cu od 100mg/kg gde je zabeležena i najveća brojnost.

Dejstvo Cd pokazuje inhibitorski efekat na rast plesni sa povećanjem njegove koncentracije. Pretpostavlja se da pojava većeg broja plesni pri koncentraciji Cd od 3 mg/kg je rezultat razvijene rezistentnosti plesni prema Cd na čvrstim podlogama. Utvrđeno je da sa povećanjem koncentracije Cd ipak dolazi do opadanja brojnosti plesni usled nemogućnosti adaptacije na veće koncentracije Cd i odsustva rezistentnih mehanizama.

Ispitvani teški metali u najvećem broju slučajeva pokazuju inhibitorski efekat na rast mikroorganizama sa povećanjem njihove koncentracije, dok razlike u povećanju broja mikroorganizama pri 3MDK koncentracijama Ni, Cu, i Cd za klonove topole M1, PE19/66 i B229 su rezultat pojave rezistentnosti filamentoznih gljiva usled aktivacije odgovarajućih odbrambenih mehanizama, rastvorljivosti metala sa promenom pH vrednosti i sastava podloge. Prisustvo rezistentnih oblika filamentoznih gljiva na određenim koncentracijama Ni, Cu i Cd bi trebalo ispitati sa stanovišta rezistentnosti vrsta, određivanja potencijalnih bioindikatora zagađenja, upotrebe određenih vrsta mikroorganizama u procesima bioremedijacije teških metala iz zemljišta, ispitivanja rezistentnosti prema antibioticima, produkcije antibiotika i uticaja sintetisanih antibiotika prema rezistentnim bakterijskim sojevima.

6. LITERATURA

- [1] T.M.Roane, I.L.Pepper (2000) Microorganisms and metal pollutants, Environmental microbiology, p.403-423.
- [2] J.H.Duffus, (2002) Heavy metals - A meaningless term, Pure Appl. Chem., 74(5), 794-799.
- [3] C.U.Anyanwu, S.C.Nwankwo, A.V.Monake (2011) Soil bacterial response to introduced metal stress, International Journal of Basic and Applied Science, 11(1), 109-113.
- [4] P. van Beelen, P.Doelman (1996) Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risk of contaminants in soil and sediment, Elsevier Science Ltd, Great Britain, p. 455-465.

- [5] B.Saharan, V.Nehra (2011) Plant growth promotion rhizobacteria: A critical review, *Life Science and Medicine Research*, LSMR-21, p.2-15.
- [6] J.D. van Elsas, T.J.Trevors, E. Wellington (1997) *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, INC, New York, New York, p. 608-636.
- [7] S.Sarkar, A.Satheshkumar, R.Jayanathi, R. Premkumar (2010) Biosorption of nickel by live biomass of *Trichoderma harzianum*, *Research Journal of Agricultural Science*, 5, 70-71.
- [8] P.Lankinen, M.A.Kähkönen, J.Rajasärkkä, M.Virta, A.Katakka (2011) The effect of nickel contamination on the growth of litter-decomposing fungi, extracellular enzyme activation and toxicity in soil, *Boreal Environment Research*, Helsinki, p. 233-237
- [9] M.Karaman, O.Petrović, P.Knežević, J.Simeunović (2010) Interekcije gljiva sa teškim metalima, Savremene tehnologije remedijacije za očuvanje i zaštitu životne sredine, *Zbornik radova*, p.164-171.
- [10] C.Lacina, G.Germain, A.Spiros (2003) Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters, *African journal of biotechnology*, 2, 625-627.
- [11] S.Congeevaram, S.Dhanarani, J.Park, M.Dexilin, K.Thamaraiselvi (2006) Biosorption of chromium and nickel by heavy metalresistant fungal and bacterial isolates, *Journal of Hazardous Materials*, Science Direct, p.227, p.276-277.
- [12] C.Englander, M.Corden (1971) Stimulation of mycelial growth of *Endothia parasitica* by heavy metals, Botany and plant pathology department, Oregon State University, Corvallis, Oregon, p.1013-1016.
- [13] S.Jha, S.Dikshit, G.Pandey (2011) *Comparative studies of bacteria and fungi for the removal of Cu²⁺ metal*, *International Journal of Pharma and Bioscience*, 15, 4-6.
- [14] P.Walker (2008) Impact of zinc and cadmium on the microbial community in soil, *Term Paper in Biogeochemistry and Pollutant Dynamics*, p.8-15.
- [15] M.Govedarica, M.Jarak, N.Milošević (1993) *Teški metali i pesticidi u zemljištu*, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, p.47-52, 60-61.
- [16] H.Babich, G.Stotzky (1976) Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: Influence of clay minerals and pH, *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, p.1059-1065.

ABSTRACT

INFLUENCE OF A Ni, Cu AND Cd ON THE NUMBER OF FILAMENTOUS FUNGI IN SOIL WITH POPLAR SPROUT CLONES M1, PE19/66 AND B229

For more than three hundred years heavy metals in addition to pesticides in the last fifty years, represent quantitatively, the most widespread pollutants in the environment. The total concentration of heavy metals in the living environment is not reflected directly on the degree of their availability to microorganisms, which further complicates an accurate assessment of the risk that heavy metals have in areas where they are present. It is important to point out influence of heavy metals on antibiotic properties of microorganisms.

During the experimental work the research was carried out examining the impacts of the specified concentrations of Ni, Cu, Cd on the number of microorganisms in the soil with 3 clones of poplar plantations. According to the obtained experimental results, the influence of Ni, Cu, Cd on the number of molds in the soil may lead to an increase in their numbers which is placed in close correlation with the corresponding poplar clones.

Keywords: Ni, Cu, Cd, abundance of filamentous fungi, land, Poplar.

Scientific paper

Paper received: 21.06.2015.

Paper accepted: 16.08.2015.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/casopis